

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/093858 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/122,
A61P 35/00, 35/04, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006038
- (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 23 日 (23.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-118581 2003 年 4 月 23 日 (23.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザ
イ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東
京都文京区小石川 4-6-10 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾崎 岩太

(OZAKI, Iwata) [JP/JP]; 〒8490937 佐賀県佐賀市鍋
島 5-1-1 佐賀大学医学部内 Saga (JP). 張 浩
(ZHANG, Hao) [CN/JP]; 〒8490937 佐賀県佐賀市鍋
島 5-1-1 佐賀大学医学部内 Saga (JP). 水田 敏彦
(MIZUTA, Toshihiko) [JP/JP]; 〒8490937 佐賀県佐賀
市鍋島 5-1-1 佐賀大学医学部内 Saga (JP). 山本
匡介 (YAMAMOTO, Kyosuke) [JP/JP]; 〒8490937 佐
賀県佐賀市鍋島 5-1-1 佐賀大学医学部内 Saga
(JP).

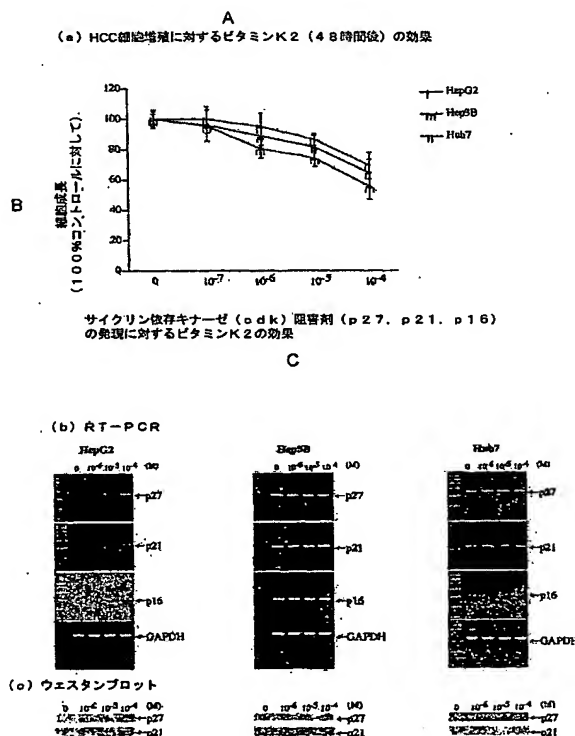
(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒
1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タ
ワー23階TMI総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続有]

(54) Title: MMP EXPRESSION INHIBITOR

(54) 発明の名称: MMP 発現抑制剤



(57) Abstract: An extracellular matrix degrading enzyme (matrix metalloproteinase: MMP) is an enzyme which is expressed in the course of tissue generation and differentiation via repeated cell division of a fertilized egg, closely relates to infiltration and metastasis of cancer too. Degradation of extracellular matrix around cancer cells and in the vascular basal membrane is an essentially required process for infiltration and metastasis of cancer. Thus, infiltration and metastasis of cancer can be prevented by inhibiting the expression of MMP. However, there have been developed few drugs which inhibit the expression of MMP and have high safety. Thus, it is intended to provide an MMP expression inhibitor.

(57) 要約: 細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) は、受精卵が細胞分裂を繰り返しながら組織を発生・分化する際に発現する酵素であるが、癌の浸潤・転移にも深く関わっており、癌の浸潤・転移にとって癌細胞周囲と血管基底膜の細胞外マトリックスの分解は必須のプロセスである。MMPの発現を抑制することによって、癌の浸潤・転移を抑制することができるが、MMPの発現を抑制する安全性の高い医薬はあまり開発されていなかった。本発明では、癌細胞によるMMPの発現を抑制する剤を提供する。

A... (a) EFFECT OF VITAMIN K2 (48 H) ON THE PROLIFERATION OF HCC CELLS
B... CELL GROWTH (100% OF CONTROL)
C... EFFECT OF VITAMIN K2 ON THE EXPRESSION OF THE CYCLIN
DEPENDENT KINASE (cdk) INHIBITORS (p27, p21, p16)
D... (c) WESTERN BLOT



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

MMP 発現抑制剤

5 技術分野

本発明は、癌細胞による細胞外マトリックス分解酵素（MMP : matrix metalloproteinase）の発現を抑制することを特徴とする医薬に関する。

背景技術

- 10 細胞外マトリックス（ECM : extracellular matrix と呼ばれることもある）は、多細胞生物体を構成する各細胞を固定、接着させる不溶性成分の総称である。細胞外マトリックスは、細胞との接着を介してその増殖、分化に影響を与えることが知られており、その主なものとしては、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどがある。細胞外マトリックスは、細胞外マトリックス分解酵素
- 15 （MMP : matrix metalloproteinase、以下「MMP」と称する）という酵素によって分解されることが知られている。MMPは、受精卵が細胞分裂を繰り返しながら組織を発生・分化する際等に発現する酵素であるが、癌の浸潤、転移にも深く関わっており、癌の浸潤、転移にとって癌細胞周囲と血管基底膜の細胞外マトリックスの分解は必須のプロセスである。

20

発明の開示

従って、MMPの発現を抑制することによって、癌の浸潤、転移を抑制することができるが、MMPの発現を抑制する安全性の高い医薬はあまり開発されておらず、かかる医薬が要望されている。

- 25 本願の発明者らは、意外にも、メナテトレノン（ビタミンK-II）が、MMPの発現を抑制するという知見を得た。本願発明の目的は、MMPの発現を抑制し、

癌細胞の増殖を抑制する効果を有する安全性の高い医薬を提供することにある。

本願発明は、(1)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、MMP発現抑制剤、(2)前記MMPが、MMP-1、MMP-3、MMP-7またはMMP-14からなる群から選択される、請求項1に記載のMMP発現抑制剤、(3)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、uPA発現抑制剤、(4)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、癌の転移、浸潤の抑制剤、(5)前記癌が肝癌である、請求項4に記載の癌の転移、浸潤の抑制剤、(6)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、AP-1の活性抑制剤、(7)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、Ets-1の発現抑制剤、(8)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、癌治療の予後改善剤、(9)MMPの発現を抑制するように、メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物の有効量を投与する工程を含む、癌細胞の転移抑制方法、(10)メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、CDKインヒビターp16、p21又はp27の発現促進剤を、提供する。

20 図面の簡単な説明

図1は、(a)はメナテトレノンの添加量と各種肝癌細胞の増殖との関係を表わすグラフである。(b)はメナテトレノンの添加量と各種肝癌細胞におけるCDKインヒビターの発現との関係を示すRT-PCR法による実験結果を表わす図である。(c)はメナテトレノンの添加量と各種肝癌細胞におけるCDKインヒビターの発現との関係を示すWestern blot法による実験結果を表わす図である。

図2は、各種肝癌細胞にメナテトレノンを添加した際の細胞周期を表わす図で

ある。

図 3 は、肝癌細胞にメナテトレノンを追加した際の肝癌細胞の浸潤の抑制結果を示す図である。

図 4 は、各種肝癌細胞にメナテトレノンを追加した際の各種浸潤関連因子の発現について、RT-PCR 法による実験結果を示す図である。

図 5 は、各種肝癌細胞にメナテトレノンを追加した際の各種浸潤関連因子の発現について、Western blot 法による実験結果を示す図である。

図 6 は、メナテトレノンを追加した際の転写因子の活性化についてゲルシフトアッセイによる実験結果を示す図である。

10 図 7 は、肝癌細胞にメナテトレノンを追加した際における、各種 MMP のプロモーター活性に及ぼす影響について、RT-PCR 法による実験結果を示す図である。

図 8 は、TPA により誘導される癌の浸潤・転移に関連する遺伝子の発現に対するメナテトレノンの影響について、RT-PCR 法による実験結果を表わす図である。

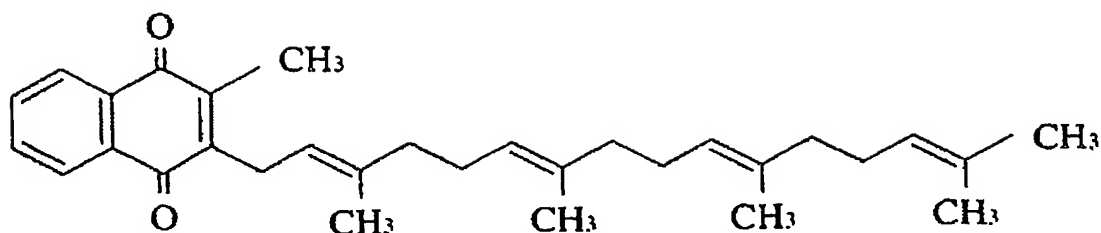
15 図 9 は、TPA により誘導される癌の浸潤・転移に関連するタンパクの発現に対するメナテトレノンの影響について、Western blot 法による実験結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

20 次に、本発明の実施の形態について説明する。以下の実施形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施することができる。

メナテトレノンとは、化学名 2-メチル-3-テトラプレニル-1, 4-ナフトキノン (2-methyl-3-tetraprenyl-1,4-naphthoquinone) である。構造式を、以下に

25 示す。



メナテトレノンとは黄色の結晶又は油状の物質で、におい及び味はなく、光により分解しやすい。また、水にはほとんど溶けない。メナテトレノンは、ビタミン

5 K-II と称され、その薬理作用は、血液凝固因子（プロトロンビン、VII、IX、X）のタンパク合成過程で、グルタミン酸残基が生理活性を有するγ-カルボキシグルタミン酸に変換する際のカルボキシ化反応に関与するものであり、肝における正常プロトロンビン等の合成を促進し、生体の止血機構を賦活して生理的に止血作用を発現するものである。

- 10 本発明における「薬理学的に許容できる塩」としては、たとえば、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、酸性又は塩基性アミノ酸との塩などが挙げられる。酸、塩基は、当該化合物1分子に対し、0.1～5分子の適宜な比で塩を形成する。

- 無機酸との塩の好ましい例としては、たとえば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などとの塩が挙げられ、有機酸との塩の好ましい例としては、たとえ
- 15 ば、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、ステアリン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。

- 無機塩基との塩の好ましい例としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩
- 20 などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。また、有機塩基との塩の好ましい例としては、たとえば、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、メグ

ルミン、N, N' -ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

酸性アミノ酸との塩の好ましい例としては、たとえば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられ、塩基性アミノ酸との塩の好ましい例としては、たとえば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられる。

- 5 本発明に係る医薬の有効成分であるメナテトレノン⁵は、無水物であってもよいし、水和物を形成していてもよい。また、メナテトレノンには結晶多形が存在することもあるが限定されず、結晶形が単一であってもよいし、複数の混合物であってもよい。さらに、本発明に係るメナテトレノンが生体内で分解されて生じる代謝物も本発明の特許請求の範囲に包含される。
- 10 本発明において用いるメナテトレノンは、自体公知の方法で製造することができ、代表的な例として、特開昭49-55650号公報に開示される方法によれば容易に製造することができる他、合成メーカーから容易に入手することもできる。また、メナテトレノンはカプセル剤、注射剤等の製剤としても入手できる。
- 15 本発明に係る医薬は、メナテトレノンをそのまま用いてもよいし、または、自体公知の薬学的に許容できる担体等（例：賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤等）、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合して慣用される方法により製剤化してもよい。また、必要に応じて、ビタミン類、アミノ酸、等の成分を配合してもよい。製剤化の剤形としては、錠剤、散剤、細粒
- 20 剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、パップ剤等があげられる。

また、本発明においては、メナテトレノンの投与形態は特に限定されないが、経口的に投与することが好ましい。メナテトレノンのカプセル剤は商品名ケイツーカプセル（エーザイ株式会社製）、グラケーカプセル（エーザイ株式会社製）

25 として、またシロップ剤は商品名ケイツーシロップ（エーザイ株式会社製）として、注射剤は商品名ケイツーN注（エーザイ株式会社製）として入手することが

できる。

メナテトレノンの好ましい投与量としては、 $1 \sim 500 \text{ mg/日}$ であり、好ましくは $10 \sim 200 \text{ mg/日}$ であり、更に好ましくは $30 \sim 135 \text{ mg/日}$ である。

- 5 MMPとは、前述のとおり matrix metalloproteinase を指し、例えば、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、MMP-7、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14等が知られているが、本願明細書中では、特にこれらに限定されることはなく、MMP全般を指す意味で用いる。
- 10 また、uPA (urokinase plasminogen activator) とは、プラスミノゲンアクチベーター (PA) の一種であり、線溶反応に関与するほか、癌の浸潤・転移にも関与する酵素である。

[実施例]

- 以下に、本発明の有利な効果を示すため、実施例、参考例を示すが、これらは
- 15 例示的なものであって、本発明はいかなる場合にも、以下の具体例に制限されるものではない。当業者は、以下に示す実施例に記載の条件を適宜変更して本発明を実施することができ、かかる変更は本願特許請求の範囲に包含される。

発明者らは、メナテトレノンが、癌細胞の、(1)増殖及び(2)浸潤・転移にどのような影響を及ぼすのかを研究するべく以下に述べる試験を行った。

20

(メナテトレノンによる癌細胞の増殖抑制作用の検討)

- 肝癌細胞株 HepG2、Huh7、Hep3B、HLE にメナテトレノンを 0M 、 10^{-6}M 、 10^{-5}M 、 10^{-4}M の濃度で添加した後、48 時間経過後に WST アッセイにより細胞増殖の検討を行った。結果を図 1 (a) に示す。図 1 (a) から明らかなように、メナテ
- 25 トレノンを添加した細胞は、いずれの細胞でも添加していない対照肝癌細胞に比べてその増殖が濃度依存的に抑制されることが分かった。

(細胞周期調節遺伝子発現の検討)

細胞増殖抑制機序を検討するために、細胞周期の進行に関与する遺伝子の発現に着目し、細胞周期を進行させる Cyclin dependent kinase(CDK)の阻害作用を有する CDK inhibitor である p21、p27、p16 の発現量がメナテトレノンの添加によってどう変化するかを、RT-PCR 法及び Western blot 法によって解析した。

(RT-PCR 法)

本試験においては、肝癌細胞株 HepG2、Huh7、Hep3B、HLE にメナテトレノンを 0 M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M の濃度で添加した後、48 時間経過後に RNA を回収し、totalRNA 1 μ g より RT-PCR を行い、p21、p27、p16 の発現を調べた。コントロールとして GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) による RT-PCR を行った。結果を図 1 (b)に示す。

15 (Western blot 法)

本試験においては、肝癌細胞株 HepG2、Huh7、Hep3B、HLE にメナテトレノンを 0 M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M の濃度で添加した後、それぞれの細胞からタンパク質を抽出し SDS-PAGE による電気泳動後、PVP 膜にブロッティングし、抗 p21、p27 抗体とインキュベーションし、ECL 法にて p21、p27 のタンパク発現を 20 調べた。結果を図 1 (c)に示す。

図 1 (b)、図 1 (c)から明らかなように、HepG2 細胞では p27 及び p21mRNA はメナテトレノンの添加濃度依存的に増加がみられた。Hep3B 細胞では p21 及び p16 の軽度増加がみられたが、p27 の変化は観察されなかった。Huh7 細胞ではこれらの発現には変化がみられなかった。

(細胞周期の検討)

メナテトレノンが癌細胞の細胞周期に与える影響について、メナテトレノンを添加した肝癌細胞の DNA 量による分布をフローサイトメトリー (FACS) により解析した。本試験においては、肝癌細胞 HepG2、Huh7、Hep3B、HLE にメナテトレノンを 0 M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M の濃度で加え、48 時間経過後に FACS による細胞周期の変化を観察した。結果を図 2 に示す。図 2 より明らかなように、メナテトレノンの添加によりいずれの細胞においても G 1 期の細胞の比率が濃度依存的に増加し、G 2 期の細胞の減少がみられた。これは、メナテトレノンが肝癌細胞の細胞周期において G 1 期から S 期への進行を抑制していることを示唆するものであり、メナテトレノンが G 1 arrest を誘導することにより肝癌細胞の増殖を抑制しているものと考えられる。

(癌細胞の浸潤・転移についての検討)

メナテトレノンの有する癌細胞の浸潤・転移を抑制する作用を検討するために、肝癌細胞 (HepG2) にメナテトレノンを 0 M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M の濃度で加えて癌細胞のマトリゲル内の浸潤能を測定した。本試験においては、タブルチャンバーの上室にマトリゲルをコートし、その上に癌細胞を撒き、メナテトレノンを添加した。下室にはフィーダーとして NIH3T3 細胞を撒いた。24 時間後にマトリゲルを通過して上室下面に移動した細胞数を顕微鏡下に観察した。結果を図 3 に示す。図 3 より明らかなように、メナテトレノンの添加濃度が大きいものほど上室下面に移動した細胞の数が減少していることが分かる。この結果により、メナテトレノンは濃度依存的に癌細胞のマトリゲル内浸潤能を抑制していることが分かる。

メナテトレノンの及ぼす MMP の発現への影響を (1) RT-PCR 試験、(2) Western blot 試験、(3) ゲルシフトアッセイ、(4) MMP 遺伝子プロモーター活性試験、及び (5) TPA による誘導時の遺伝子の発現の試験により検討した。

(RT-PCR 法)

MMP の発現を検討するために RT-PCR 法による試験を行った。本試験においては各種肝癌細胞 (HepG2、Hep3B、Huh7) にメナテトレノンを追加した場合の
5 各種MMP (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-14 (MT1-MMP))、MMP の発現に影響を与える転写因子 Ets-1 及び細胞外マトリックス受容体である β 1 インテグリンの発現を調査した。結果を図 4 に示す。図 4 から明らかなように、肝癌細胞によって発現しているMMPの種類は一部異なっていたが、メナテトレノンの添加によってMMP-1、MMP-3、
10 MMP-7 及びMMP-14 の mRNA の発現が濃度依存的に抑制されていることが分かる。また、転写因子 Ets-1 の発現も濃度依存的に抑制し、 β 1 インテグリン及び GAPDH の mRNA 発現には変化はみられなかった。

(Western blot 法)

15 MMP の発現を検討するために Western blot 法による試験を行った。本試験においては各種肝癌細胞 (HepG2、Hep3B、Huh7) にメナテトレノンを追加した場合のMMP-1 及びMMP-3 の蛋白発現を調べた。結果を図 5 に示す。図 5 より明らかなように、メナテトレノンの添加によってMMP-1 及びMMP-3 の蛋白の発現が抑制されていることが分かる。

20

(ゲルシフトアッセイ)

MMP は、そのプロモーター領域に共通して転写因子 AP-1、Ets-1、Tcf/Lef などとの結合部位を有しており、MMP の発現を調節していることが知られている。MMP の発現を調節する転写因子 AP-1、Tcf/Lef の結合活性がメナテトレノンの
25 添加により変化するかどうかをゲルシフトアッセイにより試験を行った。本試験ではメナテトレノンに肝癌細胞 HepG2 に添加して 24 時間後に核蛋白を抽出、

10

32 Pにてラベルした AP-1、Tcf/Lef の結合部位を持つ二本鎖 DNA と反応させた後、ゲルシフトアッセイを行った。結果を図 6 に示す。図 6 から明らかなように、メナテトレノン は Tcf/Lef の結合活性には変化を与えなかったが、AP-1 の結合活性を濃度依存的に抑制していることが分かる。この結合はラベル化されていない過剰の AP-1 プローブでバンドが濃度依存的に減弱し（図中「10X」、「100X」）、変異 AP-1 プローブでは変化がなかった（図中「M」）。また、抗 c-fos 抗体によりバンドの減弱、シフトが見られた（図中「S」）。以上の結果より、メナテトレノンが特異的に AP-1 の結合を抑制することが分かった。

10 (MMP 遺伝子プロモーター活性試験)

次に、MMP-1、MMP-3、MMP-7 のプロモーターレポーター遺伝子を肝癌細胞 Huh7 に導入し、メナテトレノンがこれらの MMP プロモーター活性に与える影響を調べた。MMP-1、MMP-3、MMP-7 のプロモーター-ルシフェラーゼレポータープラスミッドは下記に示す文献 1 に報告された MMP プロモーター-CAT レポータープラスミッド（文献 1）のレポーター遺伝子部分を置き換えることにより作成したものを用いた。各種 MMP-ルシフェラーゼプラスミッドをリポフェクタミンを用いて肝癌細胞 Huh7 に導入した後、メナテトレノンを各種濃度で添加し 48 時間後に細胞を回収、ルシフェラーゼ活性を測定し MMP-1、MMP-3、MMP-7 遺伝子のプロモーター活性に与えるメナテトレノンの影響を検討した。

文献 1 : Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 288-300.

25 結果を図 7 に示す。図 7 より明らかなように、メナテトレノンの添加により Huh7 細胞における MMP-1、MMP-3、MMP-7 のプロモーター活性は

濃度依存的に抑制された。特に、MMP-1及びMMP-7は50%近くその活性が低下した。これにより、メナテトレノンによるMMPの発現抑制はこれらの遺伝子プロモーター活性の抑制により起こっていることが示された。

5 (TPAによる誘導時の遺伝子の発現の試験)

- メナテトレノンによりその発現が抑制されたMMPやEts-1は、uPA (urokinase plasminogen activator)等と共に12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)により誘導される遺伝子であることが知られている。メナテトレノンが TPAによって活性化される遺伝子の発現を制御するかを探るため培養肝癌細胞
- 10 HepG2にTPAを20 nMの濃度で添加し、さらにこれにメナテトレノンを加えて TPAによって発現誘導される上記の遺伝子の発現が影響されるかをRT-PCR法及びWestern blot法にて検討した。結果を図8及び図9に示す。図8より明らかなように、肝癌細胞HepG2にTPAを20 nM添加するとMMP-1、MMP-3、MMP-7及びEts-1、さらにはuPAのmRNAの発現の増加がみられた。一方、
- 15 uPA受容体であるuPARやuPAのインヒビターであるPAIは影響を受けなかった。これらにメナテトレノンを添加するとTPAによって誘導されたMMP-1、MMP-3、MMP-7、Ets-1及びuPAのmRNAの発現は濃度依存的に抑制された。また、図9より明らかなように、メナテトレノンは、MMP-1及びMMP-3のタンパクレベルでの発現も濃度依存的に抑制した。この結果により、
- 20 メナテトレノンは、肝癌細胞において、TPAによって誘導されたMMP、Ets-1およびuPAなどの浸潤・転移に関与する遺伝子の発現を抑制することが示された。

産業上の利用可能性

- 25 本願発明によると、メナテトレノンが転写因子Ets-1の発現およびAP-1の結合活性を抑制し、細胞外マトリックスを分解する酵素であるMMP及びMMPと

ともに癌の浸潤・転移に関与している酵素である uPA の発現を抑制・防止することにより、癌細胞の浸潤、転移を抑えることができる。

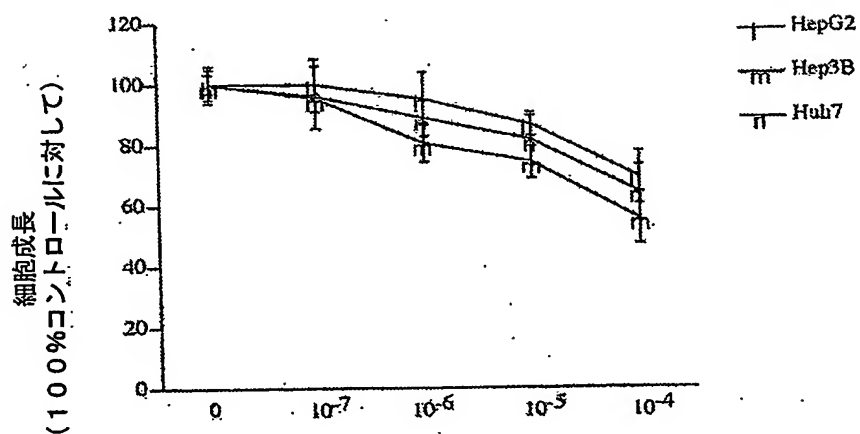
請求の範囲

1. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、MMP 発現抑制剤。
- 5 2. 前記MMPが、MMP-1、MMP-3、MMP-7またはMMP-14からなる群から選択される、請求項1に記載のMMP発現抑制剤。
3. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、uPA 発現抑制剤。
4. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を
- 10 有効成分として含有する、癌の転移、浸潤の抑制剤。
5. 前記癌が肝癌である、請求項4に記載の癌の転移、浸潤の抑制剤。
6. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、AP-1の活性抑制剤。
7. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を
- 15 有効成分として含有する、Ets-1の発現抑制剤。
8. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、癌治療の予後改善剤。
9. MMPの発現を抑制するように、メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物の有効量を投与する工程を含む、癌細胞の転移抑
- 20 制方法。
10. メナテトレノンもしくはその薬理学的に許容な塩またはそれらの水和物を有効成分として含有する、CDK インヒビターp16、p21 又は p27 の発現促進剤。

1 / 9

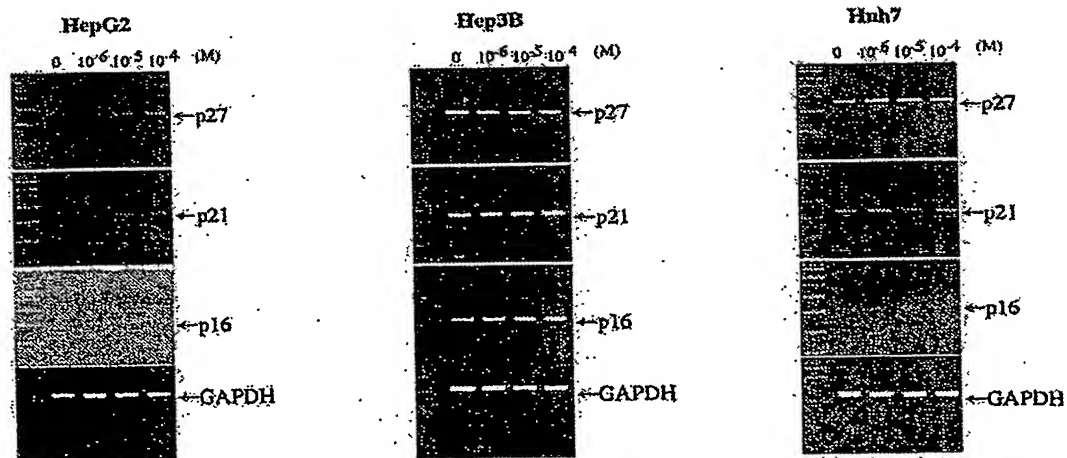
図 1

(a) HCC細胞増殖に対するビタミンK2 (48時間後) の効果

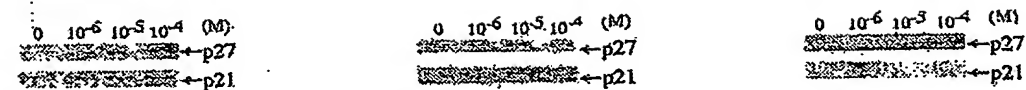


サイクリン依存キナーゼ (cdk) 阻害剤 (p27, p21, p16) の発現に対するビタミンK2の効果

(b) RT-PCR



(c) ウェスタンブロット



Best Available Copy

2 / 9

図 2

G1 アレストを介したビタミン K 2 による HCC 細胞増殖の阻害

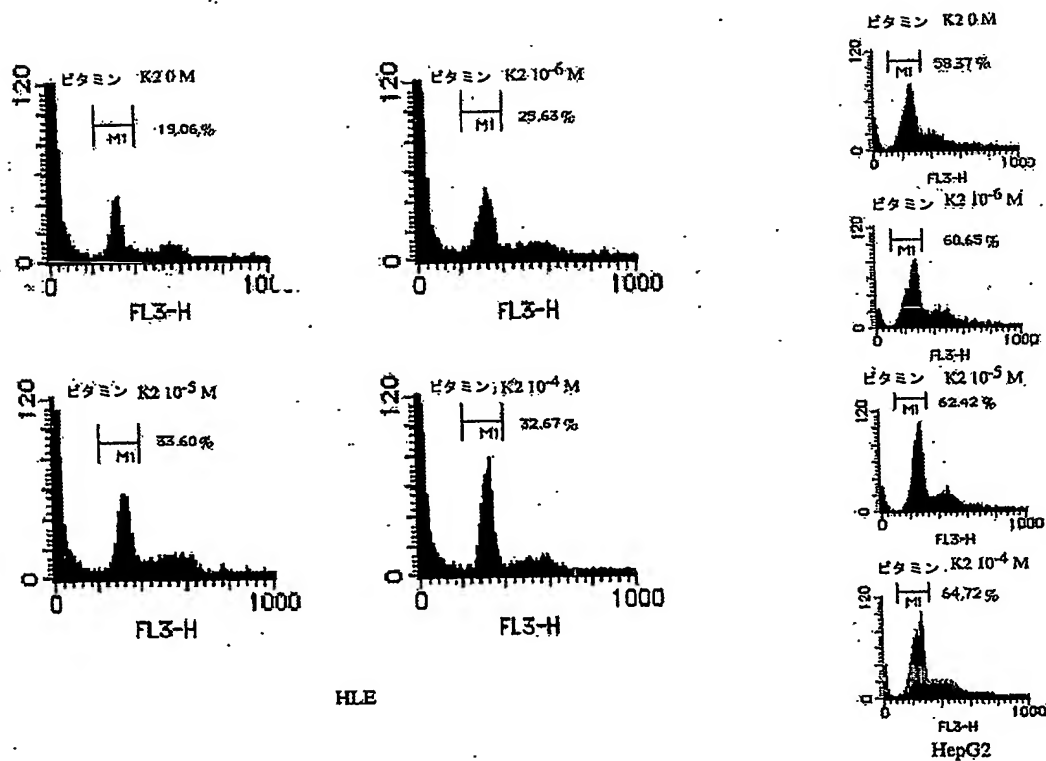
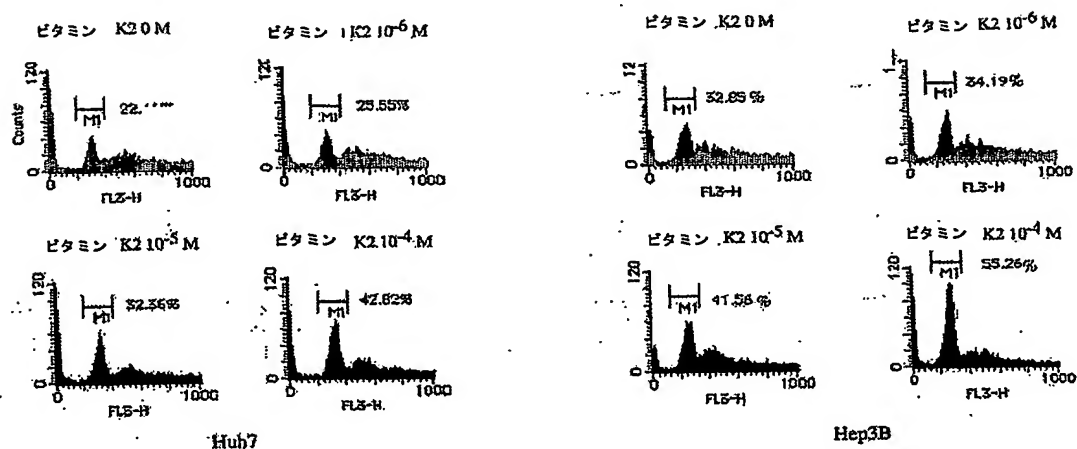
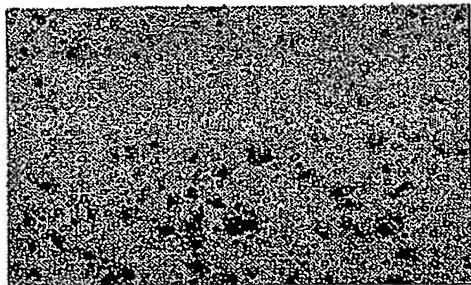
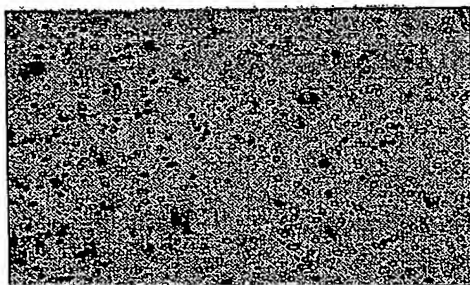
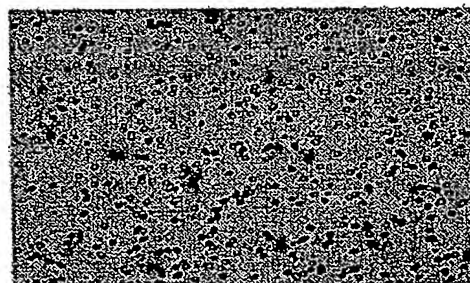


図 3

3 / 9

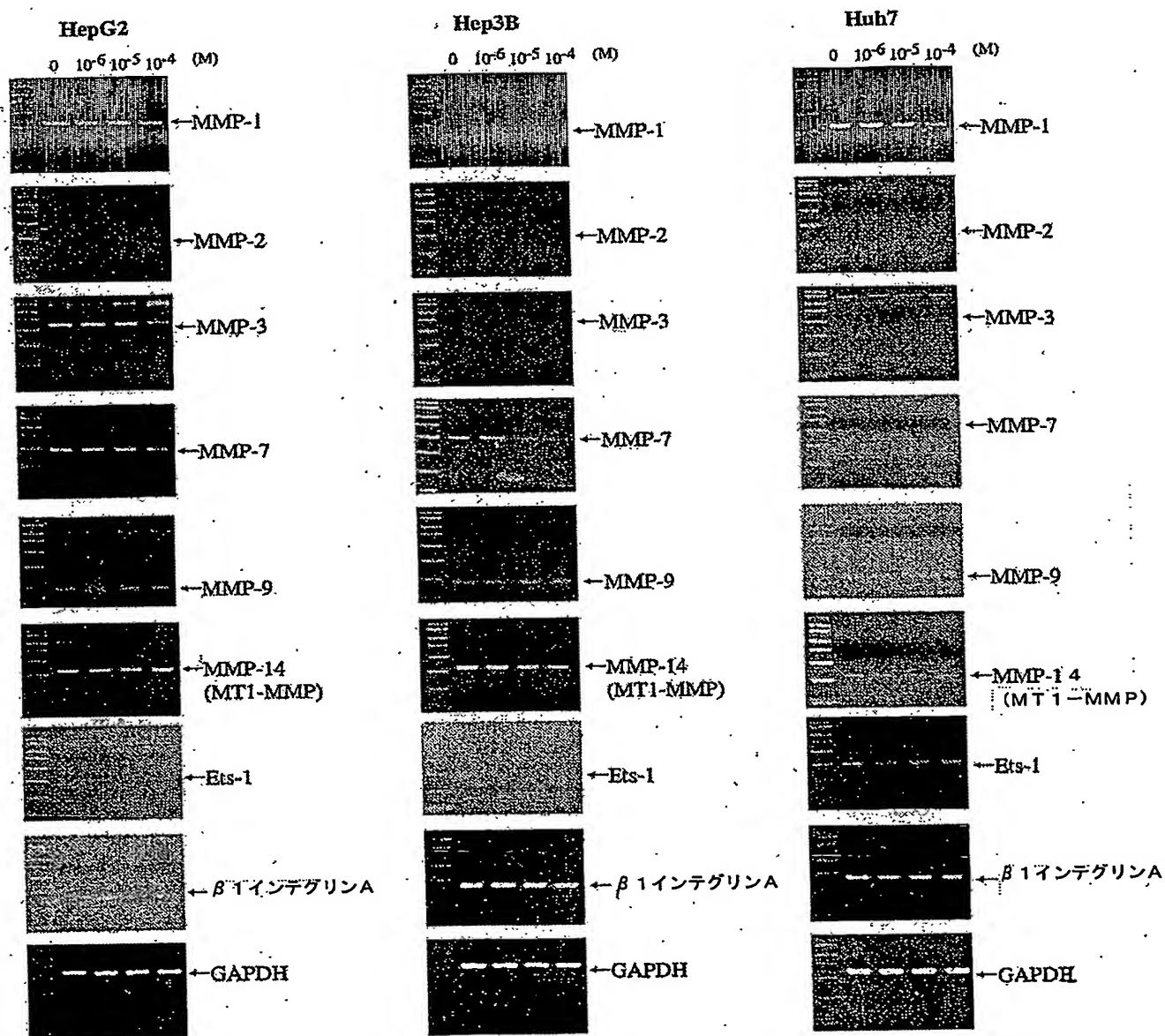
ビタミンK₂による用量依存的なHepG2細胞の浸潤性の阻害ビタミン K₂ 0 Mビタミン K₂ 10⁻⁶ Mビタミン K₂ 10⁻⁵ Mビタミン K₂ 10⁻⁴ M

Best Available Copy

図 4

4 / 9

浸潤関連因子のmRNA発現に対するビタミンK2の効果

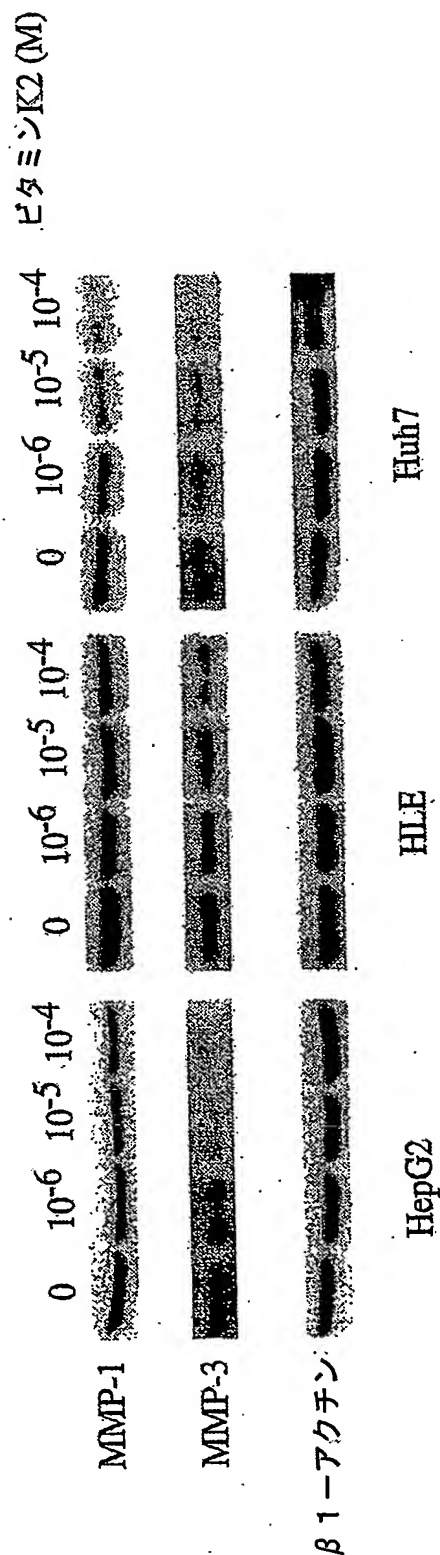


Best Available Copy

5 / 9

図 5

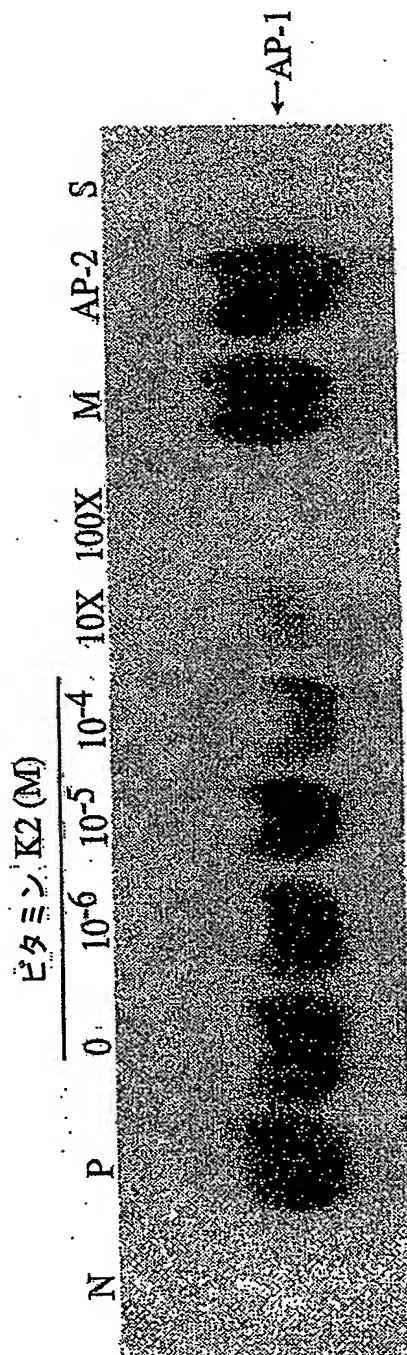
ヘパトーマ細胞におけるMMP-1とMMP-3の発現のビタミンK2による阻害



Best Available Copy

図 6

ゲルシフトによるAP-1転写因子に対するビタミンK2の効果



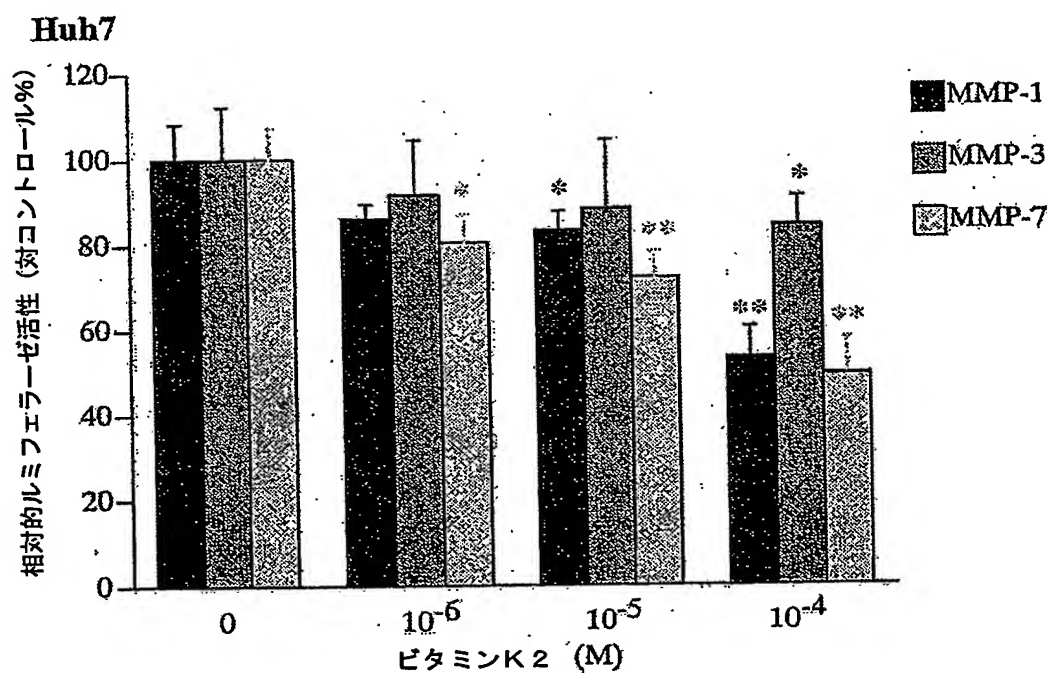
N: ネガティブコントロール、核抽出物なし
 P: ポジティブコントロール、HeLa細胞抽出物
 10X: 非標識AP-1コンペティター10倍
 100X: 非標識AP-1コンペティター100倍
 M: AP-1オリゴの変異体
 S: スーパーシフト

Best Available Copy

7 / 9

図 7

HCC細胞におけるMMPプロモーター活性のビタミンK2による阻害

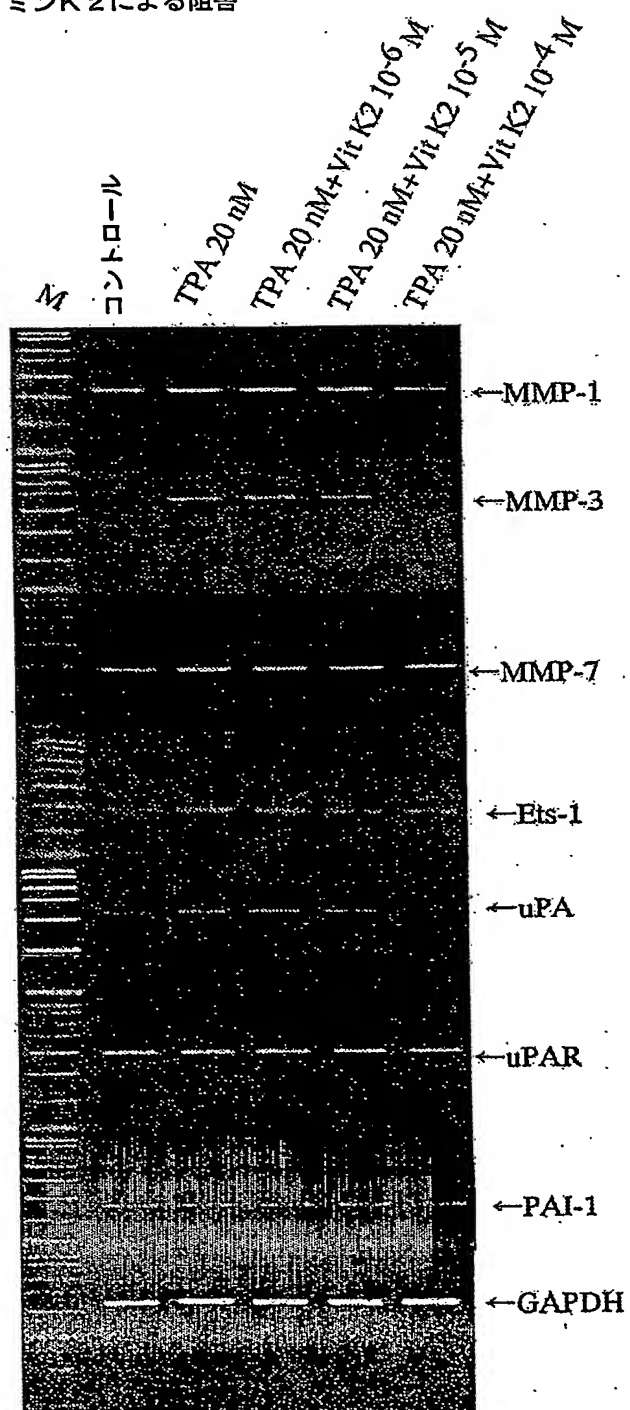


Best Available Copy

図 8

8 / 9

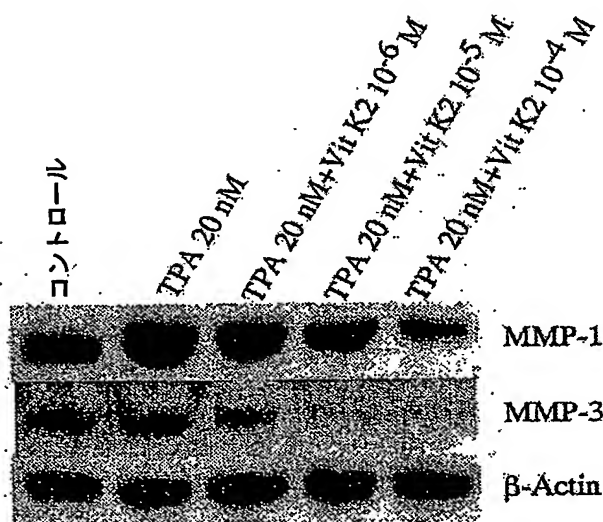
Hep G2細胞におけるTPA誘導浸潤関連遺伝子発現へのビタミンK2による阻害



9 / 9

図 9

Hep G2 細胞における TPA 誘導 MMP 発現への
ビタミン K2 による阻害



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/122, A61P35/00, 35/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/122

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OTSUKA, M. et al., Inhibition of hepatoma cell growth and invasion by Vitamin K2 administration in vitro., Hepatology, Meeting Info.: 53rd Annual Meeting on the Liver, 2002, Vol.36, No.4, Part 2, pp.445A	1-8,10
X	Toshihiko MIZUTA et al., "Vitamin K Toyo ni yoru Kansaibo Gan Saihatsu Yokusei Koka no Kento", Dai 38 Kai Nihon Kangan Kenkyukai Syorokushu, 2002, pages 135	1-8,10
X	Toshihiko MIZUTA et al., "Vitamin K ni yoru Kansaibo Gan Saihatsu Yokusei Koka no Rinshoteki Kento", Japanese Journal of gastroenterology, 2002, Vol.99, Rinji Zokango (Sokai), pp. A192	1-8,10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 July, 2004 (26.07.04)Date of mailing of the international search report
17 August, 2004 (17.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006038

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yukihiro KOIKE et al., "Monmyakunai Shuyo Shinjun (PVI) Yobo o Mokuteki to shita Vitamin KII Toyo ni yoru Randomized Prospective Controlled Study", Acta Hepatologica Japonica, 2002, Vol.43, suppl.(1), pp.A64	1-8,10
X	MIYAZAWA, K. et al., Combined treatment of leukemia cells with lalpha, 25-dihydroxy-22-oxavitamin D3 plus vitamin K2 (VK2), results in synergistic enhancement of monocytic differentiation but also inhibition of VK2-inducing apoptosis by cytoplasmic p21CIP1., Blood, Meeting Info.: 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Part 1, 2001, Vol.98, No.11, Part 1, pp.353a	1-8,10
X	WU, F.Y.-H. et al., COMPARISON OF ANTITUMOR ACTIVITY OF VITAMINS K1, K2, AND K3 ON HUMAN TUMOR CELLS BY TWO (MTT AND SRB), CELL VIBILITY ASSAYS, Life Sciences, 1993, Vol.52, No.22, pages 1797 to 1804	1-8,10
X	OKAYASU, H. et al., Cytotoxic Activity of Vitamins K1, K2 and K3 against Human Oral Tumor Cell Lines, ANTICANCER RESEARCH, 2001, Vol.21, pages 2387 to 2392	1-8,10
X	NISHIKAWA, Y. et al., Growth Inhibition of Hepatoma Cells Induced by Vitamin K and Its Analogs, J.Biol.Chem., 1995, Vol.270, No.47, pages 28304 to 28310	1-8,10
X	Tatsuyuki MIYAGAWA et al., "Vitamin K no Kogan Sayo", Vitamin, 2000, Vol.74, No.2, pages 74 to 76	1-8,10
X	JP 6-305955 A (Eisai Co., Ltd.), 01 November, 1994 (01.11.94), Claims (Family: none)	1-8,10
P,X	JP 2004-107330 A (Eisai Co., Ltd.), 08 April, 2004 (08.04.04), Claims (Family: none)	1-8,10
P,X	JP 2004-67513 A (Eisai Co., Ltd.), 04 March, 2004 (04.03.04), Claims (Family: none)	1-8,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006038

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/56351 A1 (Eisai Co., Ltd.), 08 July, 2004 (08.07.04), Claims (Family: none)	1-8, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006038

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17 (2) (a) (i) and Rule 39.1 (iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/122, A61P35/00, 35/04, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/122

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	OTSUKA, M. et al., Inhibition of hepatoma cell growth and invasion by Vitamin K2 administration in vitro. , Hepatology, Meeting Info.: 53rd Annual Meeting on the Liver, 2002, Vol.36, No.4, Part 2, pp.445A	1-8, 10
X	水田敏彦他, VitaminK投与による肝細胞癌再発抑制効果の検討, 第38回日本肝癌研究会抄録集, 2002, pp.135	1-8, 10
X	水田敏彦他, VitaminKによる肝細胞癌再発抑制効果の臨床的検討, 日本消化器病学会雑誌, 2002, 第99巻臨時増刊号 (総会), pp.A192	1-8, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.07.2004

国際調査報告の発送日

17.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	小池幸宏他, 門脈内腫瘍浸潤 (P V I) 予防を目的としたVitaminKII投与による Randomized Prospective Controlled Study, 肝臓, 2002, 第43巻, suppl. (1), pp.A64	1-8, 10
X	MIYAZAWA, K. et al., Combined treatment of leukemia cells with 1alpha, 25-dihydroxy-22- oxavitamin D3 plus vitamin K2 (VK2) results in synergistic enhancement of monocytic differentiation but also inhibition of VK2-inducing apoptosis by cytoplasmic p21CIP1. , Blood, Meeting Info.: 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Part 1., 2001, Vol.98, No.11, Part 1, pp. 353a.	1-8, 10
X	WU, F.Y.-H. et al., COMPARISON OF ANTITUMOR ACTIVITY OF VITAMINS K1, K2 AND K3 ON HUMAN TUMOR CELLS BY TWO (MTT AND SRB) CELL VIABILITY ASSAYS, Life Sciences, 1993, Vol.52, No.22, pp.1797-1804	1-8, 10
X	OKAYASU, H. et al., Cytotoxic Activity of Vitamins K1, K2 and K3 against Human Oral Tumor Cell Lines, ANTICANCER RESEARCH, 2001, Vol.21, pp. 2387-2392	1-8, 10
X	NISHIKAWA, Y. et al., Growth Inhibition of Hepatoma Cells Induced by Vitamin K and Its Analogs, J. Biol. Chem., 1995, Vol.270, No.47, pp. 28304-28310	1-8, 10
X	宮川達之他, ビタミンKの抗がん作用, ビタミン, 2000, Vol.74, No.2, pp.74-76	1-8, 10
X	J P 6-305955 A (エーザイ株式会社) 1994. 11. 01, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-8, 10
P X	J P 2004-107330 A (エーザイ株式会社) 2004. 04. 08, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-8, 10
P X	J P 2004-67513 A (エーザイ株式会社) 2004. 03. 04, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-8, 10
P X	WO 2004/56351 A1 (エーザイ株式会社) 2004. 07. 08, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8, 10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲9は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。